

## 固相萃取-反相高效液相色谱法同时测定 饲料中的角黄素和虾青素

张 华, 杨 鑫, 马 莺, 董爱军, 张英春

( 哈尔滨工业大学食品科学与工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150090 )

**摘要** :建立了一种同时测定饲料中角黄素和虾青素的固相萃取-高效液相色谱法( HPLC )。样品由乙腈提取,经 LC-NH<sub>2</sub> 固相萃取小柱净化,洗脱剂为乙腈-甲苯( 体积比为 3:1 ) ,洗脱液被浓缩后进行 HPLC 分析,色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 柱( 150 mm × 4.6 mm, 5 μm ) ,流动相为乙腈-甲醇( 体积比为 95:5 ) ,流速 1.0 mL/min,采用二极管阵列检测器检测,检测波长为 474 nm,外标法定量。角黄素和虾青素的线性范围分别为 1.0 ~ 30.0 mg/L 和 1.0 ~ 20.0 mg/L,相关系数分别为 0.999 0 和 0.999 1,回收率为 90% ~ 101%,相对标准偏差为 0.62% ~ 3.68%,检出限分别为 0.84 和 0.60 mg/L。该方法简便、快速、准确,可用于饲料中角黄素和虾青素的同时测定。

**关键词** :固相萃取;反相高效液相色谱法;角黄素;虾青素;饲料

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713( 2008 )03-0392-03 栏目类别 :技术与应用

## Simultaneous determination of canthaxanthin and astaxanthin in feedstuffs using solid phase extraction-reversed-phase high performance liquid chromatography

ZHANG Hua, YANG Xin, MA Ying, DONG Aijun, ZHANG Yingchun

( School of Food Science and Engineering, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China )

**Abstract** : A method was developed for the simultaneous determination of canthaxanthin and astaxanthin in feedstuffs using reversed-phase high performance liquid chromatography ( RP-HPLC ). The sample was extracted by acetonitrile, and cleaned up by an LC-NH<sub>2</sub> column. An Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 analytical column ( 150 mm × 4.6 mm, 5 μm ) was used and kept at 25 °C. Acetonitrile-methanol ( 95:5, v/v ) was used as the mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. The detection was performed by a diode array detector at 474 nm. The quantitative analysis of external standard calibration curves was used. The linear ranges of the method for canthaxanthin and astaxanthin were 1.0 – 30.0 mg/L (  $r = 0.999\ 0$  ) and 1.0 – 20.0 mg/L (  $r = 0.999\ 1$  ), respectively. The average recoveries were 90% – 101% with the relative standard deviations of 0.62% – 3.68%. The detection limits were 0.84 and 0.60 mg/L for canthaxanthin and astaxanthin, respectively. The method is simple, precise, sensitive and reproducible. It can be used to determine the contents of canthaxanthin and astaxanthin in feedstuffs.

**Key words** : solid phase extraction ( SPE ); reversed-phase high performance liquid chromatography ( RP-HPLC ); canthaxanthin; astaxanthin; feedstuffs

角黄素( canthaxanthin )和虾青素( astaxanthin )是两种重要的类胡萝卜素类色素,主要用作饲料添加剂、食物着色剂,也应用于医药等领域。角黄素的分子式为 C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub>,化学名称为 β,β'-胡萝卜素-4,4'-二酮,虾青素的分子式为 C<sub>40</sub>H<sub>52</sub>O<sub>4</sub>,化学名称为 3,3'-二羟基-4,4'-二酮基-β,β'-胡萝卜素。两

者具有抑制多不饱和脂肪酸的氧化、改善视力、提高免疫力、促进色素形成等重要的生物学功能<sup>[1,2]</sup>。目前常被添加到禽类及水产动物的饲料中来改善禽蛋产品及水产品的色泽,使其具有诱人的颜色,从而提高禽蛋及水产品的商品价值<sup>[3]</sup>。但近年来一些不法商家利用这两种色素生产“红心鸡蛋”用以冒

充“笨鸡蛋”,有的商家则用其饲养鱼类来冒充名贵观赏鱼等。有报道称长期过量食用含有角黄素和虾青素的食物对人体具有一定的副作用,可引起人体视网膜损伤,这已引起了世界各国的重视。1997年,欧盟食品科学委员会修正了饲料中角黄素的最大限度值:产卵母鸡用饲料为8 mg/kg,鲑鱼科及烤制品用饲料为25 mg/kg;虾青素的允许剂量为30 mg/kg。并在2003年以立法的形式颁布实施。我国农业部第318号公告规定:角黄素只能用于家禽饲料的添加剂,而虾青素只能用于水产动物饲料的添加剂。

卢红梅等<sup>[4]</sup>综述了国内外在提取和测定食物中的类胡萝卜素所采用的样品前处理方法、色谱分离条件和检测方法,指出了解食物中所含类胡萝卜素类型、结构及其含量能够给功能食品和药学研究提供全面的、可靠的数据,以及发展不经皂化处理直接进行类胡萝卜素测定的HPLC方法是类胡萝卜素测定的趋势。目前,角黄素和虾青素的检测方法有薄层色谱法<sup>[5]</sup>、分光光度法<sup>[5,6]</sup>、高效液相色谱-质谱法<sup>[7,8]</sup>。王全林等<sup>[9]</sup>采用反相高效液相色谱法同时测定咸鸭蛋黄中的角黄素和苏丹红,采用478 nm–520 nm–471 nm三段变波长检测,获得了较好的分离效果和较低的检测限。但上述方法普遍存在样品前处理复杂、分析时间长等问题。为弥补上述不足,本文利用固相萃取法进行样品前处理,建立了固相萃取-反相高效液相色谱法(SPE-RP-HPLC)同时测定饲料中角黄素和虾青素的方法。该法快速、准确、重现性好,为角黄素和虾青素的安全使用提供了科学的检测方法。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(DAD),SPE萃取装置(美国安谱(上海)公司),LC-NH<sub>2</sub>萃取小柱(250 mg 3 mL)。实验所用试剂均为色谱纯,乙腈、正丙醇、正己烷(天津科密欧),甲醇(DIMA Technology INC.);N,N-二甲基甲酰胺、无水硫酸钠、角黄素标准品(纯度不低于90%,德国Dr. Ehrenstorfer公司);虾青素标准品(纯度不低于92%,美国Sigma公司)。

样品:由哈尔滨市饲料兽药监察所提供。

### 1.2 标准溶液的配制

准确称取角黄素和虾青素标准品各10.0 mg(按实际含量折算),用N,N-二甲基甲酰胺溶液定容至100 mL棕色容量瓶中,得到质量浓度为100 mg/L的角黄素和虾青素混合标准储备液。将标准

储备液用甲醇逐级稀释,配制成质量浓度分别为1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、30.0和40.0 mg/L的标准工作溶液,于-4℃下存放(保质期1个月)。

### 1.3 样品制备

#### 1.3.1 样品的提取

准确称取10.0 g(精确至0.01 g)混匀的试样置于50 mL具塞离心管中,加入20 mL乙腈,漩涡振荡1 min后于3 000 r/min速率下离心5 min。将离心管中的乙腈层移出后,再加入20 mL乙腈,重复上述操作。合并2次得到的乙腈层,在40℃以下浓缩至2.0 mL。

#### 1.3.2 提取液的净化及浓缩

用4 mL的乙腈-甲苯(体积比为3:1)混合溶剂活化LC-NH<sub>2</sub>固相萃取小柱,然后用胶头滴管将2 mL提取液转移至SPE小柱中,用10 mL上述乙腈-甲苯混合溶液洗脱,利用真空泵调整流速,使洗脱液以约5 mL/min的流速过柱,收集洗脱液,并在40℃以下浓缩至2.0 mL。将其转移至10 mL容量瓶中,用甲醇定容,经0.45 μm微孔有机滤膜过滤,滤液供高效液相色谱测定。

### 1.4 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18(150 mm×4.6 mm,5 μm);柱温:25℃;检测波长:474 nm;流动相:乙腈-甲醇(体积比为95:5);流速:1.0 mL/min;进样体积:10 μL;外标法定量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 实验条件的选择

#### 2.1.1 提取溶剂的选择

一般常用丙酮、二氯甲烷和乙腈等作为提取溶剂。丙酮虽无毒,但一同提取出来的杂质较多,而且丙酮的挥发性较大,在操作中很容易挥发,在定容时容易造成误差。二氯甲烷的毒性与乙腈相当,但二氯甲烷沸点低,对实验人员和环境污染较大。在选择提取剂的试验中,分别用乙腈、丙酮、正己烷进行试验,其中丙酮、正己烷提取出的杂质较多,导致净化困难;乙腈的极性大,穿透力强,但乙腈在浓缩时要求的温度较高。实验表明乙腈的提取效果好,因此本实验选用乙腈作为提取溶剂。

#### 2.1.2 净化条件的选择

角黄素和虾青素是弱极性化合物,在选择净化条件的过程中,最初选取活性炭小柱和ENVI-18(十八烷基甲基硅烷基化硅胶)小柱进行净化。采用活性炭小柱进行净化时,由于角黄素和虾青素是色素类物质,活性炭小柱对其有很强的吸附作用,造成样品的回收率非常低,仅为10%~20%;采用ENVI-18小

